



TITLE:

Tric-b欠損マウスにおける骨形成不全に関する研究(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

趙, 成珠

CITATION:

趙, 成珠. Tric-b欠損マウスにおける骨形成不全に関する研究. 京都大学, 2016, 博士(薬学)

ISSUE DATE:

2016-03-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k19646>

RIGHT:

許諾条件により本文は2017-03-22に公開; 許諾条件により要旨は2016-06-01に公開

(続紙 1)

京都大学	博士（薬学）	氏名	趙 成珠
論文題目	Tric-b欠損マウスにおける骨形成不全に関する研究		
<p>細胞内の小器官である小胞体はタンパク質及び脂質合成・修飾の場であるとともに、主要なCa²⁺ストアとして機能しており、刺激に応じてCa²⁺を放出することによって筋収縮、神経伝達物質の放出、遺伝子発現調節など様々な細胞機能を制御する。TRIC (trimeric intracellular cation) チャンネルは、近年新規に同定された小胞体Ca²⁺放出を制御するカウンターイオンチャンネルである。哺乳動物にはTRIC-A及びTRIC-Bの二種類のサブタイプが存在し、TRIC-Aは興奮性組織に、TRIC-Bは全身に遍在的に発現している。TRICチャンネルの遺伝子欠損により様々な病態が惹起されることが示唆された。</p> <p>骨形成不全症 (OI) は遺伝性骨異形成症であり、典型的なOIは常染色体優性遺伝性I型コラーゲン遺伝子の変異によって起こる。最近、非コラーゲン遺伝子であるTRIC-Bの変異が、希少なヒト劣性遺伝性OIの原因であることが報告された。その一方で、病態生理学的解析は行われておらず、TRIC-Bが骨形成に果たす役割については全く不明である。そこで、本研究ではTric-bホモ欠損マウスを用いて骨形成におけるTRIC-Bの生理機能の解明を試みた。</p> <p>Tric-b欠損マウスは呼吸不全による新生致死となるため、周産期のマウスを用いて解析骨形成に関する解析を行った。マイクロCT及びvon Kossa染色を行い、Tric-bの欠損により主要骨格の骨密度低下及び石灰化障害が惹起されることを見出した。また、骨基質の主要成分であるコラーゲン含有量の低下がTric-b欠損骨で検出され、骨量低下に繋がることが推定された。アルカリホスファターゼ (ALP) / 酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ (TRAP) 陽性の骨芽細胞と破骨細胞の分布や数に大きな異常は見られなかった。しかし、電子顕微鏡を用いた観察により、Tric-b欠損骨芽細胞の小胞体が膨潤化しており、小胞体からゴルジ体にタンパクを輸送する分泌小胞の減少がみられた。以上の結果から、TRIC-Bは骨芽細胞のコラーゲン産生と細胞外への分泌を制御し、これらにより骨量を調節していると考えられた。</p> <p>Tric-b欠損が骨形成不全を引き起こすメカニズムを解明するため、骨芽細胞の細胞外基質(ECM)形成能力に注目した。頭蓋骨から単離培養し分化誘導した骨芽細胞を用いて解析を行った。その結果、Tric-b欠損骨芽細胞のECMにおける石灰化レベル及びコラーゲンの含有量が有意に低下することを見出した。更に、免疫染色を行い、コラーゲンが蓄積し膨潤化した小胞体を有する骨芽細胞がTric-b欠損マウスにおいて野生型より高頻度に出現することを明らかとした。以上の結果から、Tric-b欠損マウス由来の骨芽細胞におけるECMの形成不全は、コラーゲンの細胞外への分泌が阻害されることによって引き起こされるものと考えられた。さらに、Tric-b欠損によりコラーゲンのゴルジ体との共局在が減少していたことから、小胞体からゴ</p>			

ルジ体への輸送が損なわれていることが示唆された。

小胞体とゴルジ体の間の小胞輸送や細胞外へのタンパク質の分泌は小胞体の Ca^{2+} 放出と同調した Ca^{2+} 結合タンパクによって活性化されることが報告されている。そこで、骨芽細胞の Ca^{2+} ハンドリング機能を評価した。その結果、*Tric-b*欠損骨芽細胞において、薬物刺激に応じて小胞体から放出される Ca^{2+} は有意に低下していた。また、小胞体への Ca^{2+} の過剰な蓄積も見出された。以上の結果により、TRIC-Bの欠損は骨芽細胞の Ca^{2+} ハンドリングの異常を引き起こすことが明らかとなった。一連の結果から、小胞体 Ca^{2+} シグナルの異常が小胞体-ゴルジ輸送や細胞外への分泌不全を惹起することが示唆された。

骨形成と骨量維持は、骨芽細胞だけでなく、骨吸収に寄与する破骨細胞も協奏的に関与している。そこで、初代培養破骨細胞を用いて解析を行った。マウス胎児の肝臓から破骨細胞前駆細胞を単離して分化誘導を行った。その結果、分化シグナルとして必要であるReceptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL)刺激による小胞体 Ca^{2+} オシレーションは*Tric-b*欠損破骨細胞においても野生型破骨細胞と大きな違いは観られなかった。また、*Tric-b*欠損破骨細胞のTRAP陽性細胞の形態や数量だけでなく、骨吸収能力についても野生型のものと有意差がないことを見出した。従って、これらの結果からは、破骨細胞の分化、形態及び骨吸収能力に対する*Tric-b*欠損の与える直接的影響は示されなかった。

以上の一連の研究により、TRIC-Bが骨芽細胞において Ca^{2+} 放出を正常に機能させるために必須の分子であり、コラーゲンの正常な合成・分泌を介した骨形成に寄与していることを明らかとした。本研究で得られた知見は、骨形成におけるTRIC-Bの生理機能の解明及び、骨疾患に対する創薬標的候補分子の拡大に伴う治療薬の開発に役立つことが期待される。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、小胞体タンパク質TRIC-Bの生理機能及び骨形成関連の病態との関係を解明することを目的に、TRIC-Bの遺伝子欠損マウスの表現形を解析した論文である。

TRIC-Bは、小胞体Ca²⁺ストアの細胞質への放出に際して小胞体内腔へ陽イオンを移動させ、持続的かつ安定したCa²⁺放出を助けるカウンターイオンチャネルとして近年同定された新規小胞体タンパク質である。TRIC-B遺伝子欠損マウスは主に肺におけるサーファクタント分泌不全により呼吸困難となり新生直後に死亡することが過去の解析から明らかとなっている。その一方、様々な組織や細胞において普遍的に発現しているTRIC-Bの生理機能の全容は解明されていない。また、TRIC-B遺伝子に大きな欠失をもたらす変異を有するヒトにおいては、家族性の骨形成不全症が発症することが近年報告され、TRIC-Bが骨形成に重要な役割を果たしていることが強く示唆されていたものの、その病態生理的解析は行われていなかった。そこで申請者は、TRIC-B遺伝子欠損マウスを用いて、骨形成に注目した表現形解析を行い、TRIC-Bの骨形成における生理機能の解明を試みた。

遺伝子欠損マウスを用いて遂行された本研究により、TRIC-Bは骨芽細胞における正常な小胞体Ca²⁺ハンドリングに必須であることが示された。TRIC-B欠損骨芽細胞においては、小胞体Ca²⁺ストアが過剰に増加するとともに、刺激に応じたCa²⁺放出が減弱した。更に、TRIC-B欠損骨が細胞において、骨基質コラーゲンの細胞外への分泌が減少し、小胞体内へ蓄積していることが観察された。これらの結果から、TRIC-Bは骨芽細胞におけるCa²⁺ハンドリング及びコラーゲンの合成分泌に寄与することが解明された。さらに、TRIC-B遺伝子変異によるヒト骨形成不全症の病理機序の全容解明に向けて、本研究は重要な知見を提供するものである。

本論文は博士(薬学)の学位論文として価値あるものと認める。

更に、平成28年2月22日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。

要旨公表可能日： 2016年 6月 1日以降